

【 17 】

氏名 朴 春 権

学 位 の 種 類 学 術 博 士

学 位 授 与 番 号 博 甲 第 941 号

学 位 授 与 の 日 付 平 成 3 年 3 月 28 日

学 位 授 与 の 要 件 自 然 科 学 研 究 科 生 物 資 源 科 学 専 攻

(学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当)

学 位 論 文 題 目 STUDIES ON FERTILIZATION AND DEVELOPMENT IN
VITRO OF BOVINE OOCYTES MATURED IN CULTURE
(牛卵胞卵の体外受精および培養に関する研究)

論 文 審 査 委 員 教授 丹羽皓二 教授 猪 貴義 教授 田辺 昭
教授 内田仙二 教授 山本 格

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、体外成熟卵子への精子侵入時期、成熟過程に伴う精子侵入様式の変化および体外受精卵子の初期発生におよぼす種々の培養条件について検討した結果をまとめたものである。凍結・融解牛精子の受精能獲得と先体反応は、カフェインとヘパリンの存在下で1時間以内に誘起されることが示唆されたが、卵丘付着卵子への侵入は受精後3時間から開始された。また、成熟過程にある未熟卵子においても囲卵腔への精子侵入および卵細胞質内に侵入した精子頭部の脱濃縮は可能であるが前核形成は困難であることが明らかとなった。体外成熟後に得られた体外受精卵は、受精後8時間で発生培地へ移して培養することによって発生を継続するが、この時卵丘細胞あるいは卵管上皮細胞と共培養することによって発生率は高くなった。また、卵丘細胞との共培養において、牛胎児血清および子牛血清よりも牛血清アルブミンの添加が初期発生に促進的効果を有することが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

最近、牛卵子の体外受精において、精子の受精能獲得に対するカフェインとヘパリンの相乗効果を利用した新しい系が多用されている。本論文は、この系を用いて行われた牛未熟卵子の体外受精と受精卵の体外培養に関する基礎的実験から得られた次のような成果をまとめたものである。

- 1) 体外成熟卵子への精子侵入時期：卵丘細胞を有した卵子では精子前培養(5-5.5

時間)の有無にかかわらず、授精後3時間で精子侵入が認められたが、裸化卵子では1時間以内に精子侵入が観察され、授精後1-5時間の侵入率には精子前培養の有無による差は認められなかった。したがって、精子の受精能獲得は、この系において卵丘細胞の有無とかかわりなく1時間以内に誘起されることが示唆された。

2) 卵子の成熟過程における精子侵入：成熟培養の種々の時間で未熟卵子に授精した結果、いずれの成熟段階にある卵子においても高い(95-100%)侵入率が得られた。雌雄両前核の形成は成熟培養4時間までは全く認められなかったが、成熟の進行にともなってその割合は増加した。卵核胞(GV)期の卵子において、授精後8時間で侵入率は頂点(95%)に達したが、侵入卵の大部分はGV期および濃縮GV期に止まっており、授精後20時間においても雄性前核は形成されなかった。成熟培養に最適と考えられているTC-199液を用いて同様の受精実験を行った結果、とくにGV期の卵子において、授精後20-22時間で62-69%の侵入率が得られたが、ほとんどの卵子においてGVが崩壊したにもかかわらず、完全な成熟はやはり阻害され、雄性前核も全く形成されなかった。これらの結果から牛未熟卵子ではすべての成熟過程において精子侵入が可能であり、卵細胞質内の精子核は脱濃縮しうることが明らかとなった。しかし、この系におけるGV期卵子の成熟阻害は培地に含まれるカフェインとヘパリンによるものと推察され、それによって雄性前核の形成も阻害されるものと考えられた。

3) 受精卵の初期発生におよぼす要因：まず初期分割(8-16細胞期)に要する条件を検討し、授精後できるだけ早い時期(8あるいは16時間)に、卵子を牛胎子血清を添加した発生培地に移すことによって分割率が高くなることを見いだした。この時、乳酸やピルビン酸などの基質の培地への添加は必要でない。さらに、初期分割卵を卵丘細胞または卵管上皮細胞と共培養することにより、桑実期あるいは胚盤胞期までの発生率が高くなること、また卵丘細胞との共培養において、血清よりも牛血清アルブミン($1-10\text{mg/ml}$)の培地への添加が効果のあることを見いだした。

本学位審査会は、上記の論文内容および参考論文を総合的に審査し、本論文が学術博士の学位に値するものと判定した。